



FR2769022

Biblio

Desc

Claims

Page 1

Drawing

**No titl availabl .**

Patent Number: FR2769022
Publication date: 1999-04-02
Inventor(s): AMEDEE JOELLE; ROUX DIDIER; DELORD BRIGITTE; FREUND OLIVIER;
LAVERSANNE RENE; MAHY PATRICK
Applicant(s):: CAPSULIS (FR)
Requested Patent: ☐ FR2769022
Application Number: FR19970012085 19970929
Priority Number (s): FR19970012085 19970929
IPC Classification: C12N15/88 ; A61K39/02
EC Classification: [A61K9/127](#), [A61K9/127B2](#), [A61K39/39](#)
Equivalents: AU9169798, ☐ [EP1024830](#) (WO9916468), JP2001518452T, ☐ [WO9916468](#)

Abstract

The invention concerns an antigen vector, in particular a protein antigen, consisting of a dispersion of multilamellar vesicles within which said antigen is at least partially encapsulated, said vesicles consisting of two layers comprising at least a surfactant, said two layers being concentric and providing said vesicles with an onion-like structure. The invention also concerns compositions containing at least an antigen against which it is desired to produce antibodies, said antigen being partially encapsulated in such a vector. The invention further concerns the method for preparing said compositions.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 769 022

②① N° d'enregistrement national : **97 12085**

⑤① Int Cl⁶ : C 12 N 15/88, A 61 K 39/02

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 29.09.97.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 02.04.99 Bulletin 99/13.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CAPSULIS SOCIETE ANONYME —
FR.

⑦② Inventeur(s) : MAHY PATRICK, DELORD BRIGITTE,
AMEDEE JOELLE, FREUND OLIVIER, ROUX DIDIER
et LAVERSANNE RENE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

⑤④ VECTEURS D'ANTIGENES ET COMPOSITIONS THERAPEUTIQUES CONTENANT DES ANTIGENES.

⑤⑦ L'invention concerne un vecteur d'antigène, en particulier d'antigène protéique, constitué d'une dispersion de vésicules multilamellaires au sein desquelles ledit antigène se trouve au moins partiellement encapsulé, lesdites vésicules étant constituées de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites bicouches étant concentriques et conférant auxdites vésicules une structure en oignon.

Elle concerne également des compositions pharmaceutiques contenant au moins un antigène partiellement encapsulé dans un tel vecteur.

Elle concerne également le procédé de préparation de ces compositions.

FR 2 769 022 - A1



La présente invention concerne des vecteurs d'antigènes ainsi que des compositions thérapeutiques à activité immunitaire potentialisée.

5 Plus de 100 ans après la découverte des agents infectieux par Louis Pasteur, la question suivante est toujours d'actualité: comment préparer le système immunitaire à être durablement efficace contre une infection, dans des conditions de sécurité totale ? L'enjeu des recherches est non seulement de mettre au point de nouveaux vaccins, mais aussi d'améliorer ceux déjà existants, en réduisant le
10 nombre d'injections.

De nos jours, la plupart des vaccins viraux sont des virus vivants atténués. Cette stratégie a été moins fructueuse contre les bactéries puisqu'un seul vaccin bactérien atténué est utilisé à ce jour : le BCG. La démarche d'atténuation des microorganismes a fait d'énormes progrès grâce aux techniques de Biologie
15 Moléculaire qui rendent possible de modifier la fonction de virulence de ces agents pathogènes. Néanmoins, il est difficile de concilier l'atténuation de cette virulence et une stimulation efficace des défenses immunitaires. Les vaccins dits moléculaires, à base d'antigènes purifiés exigent le concours d'adjuvants à propos desquels toute une recherche reste encore à développer. A titre d'exemple, le
20 premier vaccin de ce type a été mis au point contre l'hépatite B en 1987 à partir d'une protéine de l'enveloppe virale (antigène HBs) produite par les cellules animales. Ces vaccins moléculaires sont encore peu nombreux car les antigènes purifiés sont rapidement éliminés par l'organisme. De plus, les antigènes purifiés, injectés seuls sont peu efficaces et nécessitent l'emploi de substances qui
25 favorisent leur reconnaissance par le système immunitaire et qui ralentissent leur dégradation : les adjuvants. Actuellement, l'hydroxyde d'aluminium $Al(OH)_3$, découvert en 1926, est un adjuvant autorisé chez l'homme. De nouvelles substances ont été découvertes au cours des dernières années : dérivés synthétiques de la paroi des mycobactéries (muramyl dipeptide et ses dérivés).

30 Cependant, la démonstration de l'innocuité de ces nouveaux agents nécessite une multitude de tests, avant qu'ils puissent être utilisés dans des vaccins à usage humain. Enfin se pose le problème du nombre d'injections ; car en l'absence de rappels, la mémoire immunitaire devient alors insuffisante.

La vaccination moderne, en particulier celle basée sur l'utilisation de
35 protéines recombinantes, est basée sur la réponse immunitaire liée à l'administration d'un antigène par différentes voies (intramusculaire, per os).

Cependant, du fait soit de la biodisponibilité insuffisante de l'antigène (association insuffisante avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, trop courte durée de demi-vie, protéolyse, absence de reconnaissance par les cellules présentatrices d'antigène) soit d'une reconnaissance imparfaite des déterminants antigéniques par les cellules immunitaires, même lorsque la séquence protéique est conçue de façon optimale (ex : les glycoprotéines associées au virus VIH, ou les marqueurs tumoraux), la réponse immunitaire in-vivo peut être parfois décevante.

Il existe donc un très grand intérêt à vectoriser ces molécules afin de tenter de pallier aux limitations décrites ci-dessus.

Classiquement, la vaccination vise une réponse immunitaire humorale. Ce système protège l'individu vacciné d'une exposition éventuelle à l'agent pathogène, prévenant de la sorte, la dissémination d'une infection extra-cellulaire. Cependant, il est impuissant vis-à-vis d'une infection intracellulaire. La réponse immunitaire cellulaire est donc le complément indispensable à l'élimination de la cellule infectée. Par conséquent une vaccination idéale fait appel aux 2 voies, cellulaire et humorale. La voie cellulaire permet l'élimination d'agents pathogènes intracellulaires tels que les virus ou les cellules cancéreuses. Il est à l'heure actuelle difficile d'administrer un antigène assurant une réponse immunitaire adéquate, ceci rendant inopérant une vaccination contre des antigènes tumoraux spécifiques (ex: cancer du sein) ou contre des antigènes faiblement immunogènes (ex: glycoprotéine associées au VIH).

Il existe donc un besoin évident d'une méthode qui permettrait de vectoriser les antigènes afin d'induire une réponse cellulaire en excluant d'éventuels chocs anaphylactiques ou une protéolyse dans le sérum.

Une multitude de maladies pourrait bénéficier de l'administration de protéines ou de peptides antigéniques thérapeutiques vectorisés. Ceci permettrait de réduire les effets secondaires indésirables liés à la trop grande quantité d'antigènes à administrer afin de "susciter" la réponse immunitaire (ex: vaccination anticancéreuses).

Les inventeurs de la présente invention ont mis au point, pour différentes applications dans des domaines totalement différents de ceux de la présente invention, des vésicules multilamellaires qui présentent une structure dite en "oignon" et sont constituées, de leur centre jusqu'à leur périphérie, d'une succession de couches lamellaires séparées par un milieu liquide. Ces vésicules peuvent être obtenues par un procédé comprenant la préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide et sa transformation par application d'un cisaillement. Un

tel procédé est en particulier décrit dans le brevet WO 93/19735 issu du brevet français FR-2 689 418 ou WO 95/18601 introduits ici par référence.

5 Selon le brevet français FR-2 689 418, cette transformation peut être faite lors d'une étape de cisaillement homogène de la phase cristal-liquide, ce qui conduit à des vésicules encore appelées microcapsules de taille contrôlée. Toutefois, en jouant sur la formulation de la phase lamellaire cristal-liquide, en particulier sur la nature des tensioactifs entrant dans sa composition, la transformation de cette phase cristal-liquide en vésicules peut être obtenue par simple sollicitation mécanique, en particulier lors du mélange des constituants.

10 Les recherches menées par les inventeurs les ont amenés à découvrir que l'utilisation des technologies décrites ci-dessus permettait la mise au point de nouveaux vecteurs multilamellaires de petite taille pouvant être utilisés pour vectoriser des antigènes avec, pour résultat d'augmenter la réponse immunitaire de la cellule ciblée, une grande efficacité d'encapsulation ainsi qu'une grande facilité
15 de préparation.

Un tel vecteur se comporte donc, à bien des égards, comme un adjuvant particulièrement intéressant de vaccination.

Un autre avantage est que toutes les molécules entrant dans la préparation des compositions de l'invention sont disponibles commercialement.

20 Un autre avantage du procédé permettant la préparation des compositions de l'invention est qu'il permet d'utiliser une grande variété de tensioactifs.

Plus précisément, la présente invention propose un nouveau moyen de vectorisation des antigènes en vue d'augmenter la réponse immunitaire de la cible
25 cellulaire visée. La présente invention vise plus précisément une méthode pour administrer un antigène permettant d'améliorer significativement la réponse immunitaire aussi bien cellulaire qu'humorale.

Ainsi, selon une de ses caractéristiques essentielles, l'invention concerne un nouveau vecteur d'antigène, constitué d'une dispersion de vésicules multilamellaires au sein desquelles ledit antigène se trouve au moins partiellement
30 encapsulé, lesdites vésicules étant constituées de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites bicouches étant concentriques et conférant auxdites vésicules une structure en oignon.

Par antigène, on entend toute substance qui induit la production
35 d'anticorps. Une substance antigénique comprend au moins un déterminant

antigénique ou épitope, qui sont des motifs moléculaires reconnus par des anticorps spécifiques et/ou des cellules de l'immunité spécifique.

Les antigènes utilisés selon l'invention sont avantageusement des antigènes de type protéique. Il pourra, en particulier, s'agir d'antigènes constitués
5 de protéines naturelles ou recombinantes.

Par structure en "oignon", on entend, comme exposé précédemment, une structure multilamellaire, dans laquelle les vésicules de forme sensiblement sphérique sont constituées d'une succession de bicouches concentriques et, cela, du centre à la périphérie des vésicules, d'où le nom de structure en oignon utilisé,
10 par analogie, pour qualifier de telles structures.

De telles structures sont avantageusement obtenues par incorporation d'au moins un antigène dans une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif puis transformation de cette phase cristal-liquide lamellaire en une phase dense de vésicules multilamellaires de petite taille.

Ainsi, selon une autre caractéristique essentielle de l'invention, elle
15 concerne un procédé de préparation d'une composition contenant au moins un antigène, selon lequel on prépare une phase cristal-liquide lamellaire incorporant ledit antigène et on provoque le réarrangement de ladite phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires par application d'un cisaillement.

Ce cisaillement pourra être un cisaillement homogène, ce qui présente
20 l'avantage de conduire à des vésicules de taille parfaitement homogène. Toutefois, une simple agitation mécanique pourra s'avérer suffisante pour conduire à la formation des vésicules multilamellaires de l'invention.

Selon une autre caractéristique encore, l'invention concerne les
25 produits susceptibles d'être obtenus par ce procédé.

Selon le brevet français FR-2 689 418, cette transformation peut être faite lors d'une étape de cisaillement homogène de la phase cristal-liquide, ce qui conduit à des vésicules ou microcapsules de taille contrôlée. Toutefois, en jouant sur la formulation de la phase lamellaire cristal-liquide, en particulier sur la nature
30 des tensioactifs entrant dans sa composition, la transformation de cette phase cristal-liquide en vésicules peut être obtenue par simple sollicitation mécanique, en particulier lors du mélange des constituants.

La formulation fait avantageusement intervenir un mélange de molécules tensioactives. Il est généralement utilisé au moins deux tensioactifs
35 différents ayant des balances hydrophile-lipophile différentes, ce qui permet de

réglér en continu les propriétés des bicouches et ainsi de contrôler l'apparition de l'instabilité qui gouverne la formation des vésicules multilamellaires.

Selon une variante avantageuse, les vésicules constituant les compositions de la présente invention ont des diamètres inférieurs à 10 μm , de préférence inférieurs à 1 μm , de préférence compris entre 0,1 et 1 μm .

Selon une variante avantageuse, les membranes des vésicules contenues dans les compositions de l'invention contiennent au moins un agent tensioactif choisi dans le groupe constitué :

- des phospholipides hydrogénés ou non hydrogénés,
- 10 - des acides gras en C_6 à C_{18} , saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, sous forme d'acide ou de sel d'un métal alcalin, alcalino-terreux ou d'une amine,
- des esters, éthoxylés ou non, de ces mêmes acides gras et
 - . de saccharose,
 - 15 . de sorbitan
 - . de mannitol,
 - . de glycérol ou de polyglycérol,
 - . de glycol,
- des mono-, di- ou triglycérides ou des mélanges de glycérides de ces mêmes acides gras,
- 20 - des alcools gras en C_6 à C_{18} , saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, éthoxylés ou non,
- des éthers, éthoxylés ou non, de ces mêmes alcools gras et
 - . de saccharose,
 - 25 . de sorbitan,
 - . de mannitol,
 - . de glycérol ou de polyglycérol,
 - . de glycol,
- des huiles végétales polyéthoxylées, hydrogénées ou non hydrogénées,
- 30 - des polymères séquencés de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène (poloxamères),
- de l'hydroxystéarate de polyéthylèneglycol,
- des alcools à squelette stérol tel que le cholestérol, le sistostérol.

Les tensioactifs choisis, en particulier les tensioactifs cités ci-dessus, sont avantageusement choisis dans la catégorie des tensioactifs permis par la

législation pour l'utilisation pharmaceutique en fonction de la voie d'administration.

On choisira avantageusement parmi les tensioactifs ci-dessus, deux tensioactifs présentant des propriétés relativement différentes, en particulier une
5 balance hydrophile-lipophile (HLB) différente. Le premier tensioactif présentera avantageusement une balance hydrophile-lipophile comprise entre 1 et 6, de préférence entre 1 et 4, alors que le deuxième tensioactif aura une balance hydrophile-lipophile comprise entre 3 et 15, de préférence comprise entre 5 et 15.

Comme on l'a vu précédemment, un meilleur contrôle de la taille des
10 vésicules multicouches pourra être obtenu en procédant selon le brevet FR 2 689 418.

La préparation obtenue après transformation de la phase lamellaire cristal-liquide en vésicules multilamellaires peut ensuite être diluée, en particulier avec un solvant aqueux pour obtenir ainsi une suspension aqueuse de vésicules.

15 La technique d'encapsulation utilisée selon la présente invention permet d'atteindre aisément des rendements d'encapsulation très élevés, voir voisins de 100 %. Toutefois, de tels rendements ne sont pas toujours indispensables en fonction des applications visées.

Ainsi, le rendement d'encapsulation du (ou des) antigène(s) dans les
20 compositions de l'invention est avantageusement supérieur à 50 %, de préférence supérieur à 80 %.

L'invention fournit un moyen de vectorisation d'antigènes, en particulier d'antigènes de type protéique, cette vectorisation pouvant être réalisée in vivo après injection par voie intraveineuse ou intrapéritonéale.

25 Selon une autre de ses caractéristiques essentielles, l'invention concerne une composition thérapeutique contenant au moins un antigène dans laquelle ledit (lesdits) antigène(s) se trouve(nt) au moins partiellement encapsulé(s) dans les vésicules multilamellaires d'un vecteur tel qu'il a été défini précédemment.

30 Enfin, selon une autre de ses caractéristiques essentielles, l'invention concerne un procédé de préparation des compositions définies précédemment.

Ce procédé comprend les étapes suivantes de :

- préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif et incorporant le(les) antigène(s),
- 35 - transformation de la phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires à structure en oignon, par cisaillement,

- dispersion dans une solution aqueuse pour obtenir la concentration voulue en antigène(s).

Plus précisément, selon ce procédé, on prépare dans une première étape une phase cristal-liquide constituée d'un mélange de molécules amphiphiles et d'une solution aqueuse contenant le (ou les) antigène(s). La phase aqueuse peut contenir, en particulier, un tampon PBS ou tout autre solution physiologique. L'homme du métier choisira la nature des tensioactifs et leurs proportions de façon à avoir une transformation ultérieure aisée de la phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires à structure en oignon. Il choisira avantageusement pour ces tensioactifs au moins une molécule amphiphile plutôt hydrophobe présentant de préférence une HLB inférieure à 4 et une autre molécule amphiphile plutôt hydrophile présentant une HLB de préférence supérieure à 5. Un tel choix permettra une transformation aisée de la phase cristal-liquide.

Dans une seconde étape, le mélange homogène constitué de la phase cristal-liquide formée est cisailé selon un des procédés décrits précédemment. On appliquera avantageusement un cisaillement homogène pour obtenir une taille faible et régulière des vésicules. Toutefois, l'utilisation d'un tel cisaillement homogène ne s'avère pas toujours nécessaire et, à condition de jouer sur la formulation de la phase cristal-liquide, un simple mélange dans un mélangeur industriel peut permettre de transformer la phase lamellaire cristal-liquide en vésicules multilamellaires selon l'invention.

Dans une troisième étape, le mélange constitué des vésicules multilamellaires selon l'invention est dispersé dans un excès de solution aqueuse, par exemple de sérum physiologique, pour amener ce mélange à la concentration en antigène voulue.

L'invention est illustrée par les exemples qui suivent qui montrent qu'il est possible d'envisager l'utilisation des microvésicules multilamellaires de tensioactifs pour la vaccination humaine et animale avec les avantages suivants :

1) On démontre l'intérêt de vectoriser un ou plusieurs antigènes, séparément ou ensemble dans des vésicules multilamellaires de petite taille.

2) On peut envisager, compte tenu de l'augmentation de la réponse immunitaire, l'utilisation d'une quantité moindre d'antigène. Ceci peut être important lorsqu'on envisage de recourir à des antigènes recombinants.

3) Dans certains cas, la réponse à l'antigène est trop faible et l'amplification de l'immunité par la microencapsulation permet d'envisager l'utilisation de molécules faiblement immunogènes.

4) La rapidité du développement de la réponse immunitaire permet d'envisager une diminution des écarts entre la mise en oeuvre des rappels successifs. En effet, au dernier rappel, seules 30% des personnes traitées se présentent et donc 70% des individus, bien qu'ayant subi une première injection, ne sont pas immunisés efficacement. Un délai plus bref entre les rappels devrait assurer une meilleure vaccination de la population.

5) L'augmentation de la réponse d'origine cellulaire est la garantie d'une meilleure vaccination.

6) Le fait que l'effet d'amplification de la réponse immunitaire d'un antigène encapsulé soit encore plus net avec la présence d'un adjuvant tel que le QS21 permet d'envisager (sans obligation) des couplages technologiques.

En conclusion, les résultats démontrent un effet amplificateur de la réponse immunitaire qui est très général et peut potentiellement être appliqué dans de nombreux vaccins humains et animaux.

EXEMPLES

Exemple 1

Préparation et caractérisation d'une composition contenant des antigènes encapsulés

On prépare une composition contenant des vésicules multilamellaires et présentant la composition suivante dans laquelle les proportions sont exprimées en pourcentages en poids :

phosphatidylcholine (PC90 de Natterman)	45,5
oléate de potassium	5
cholestérol	5
sulfate de cholestérol	2,5
laureth 4 (lauropal 4 de Witco)	2
solution aqueuse à 10 mg/ml d'albumine sérique humaine (HSA)	40

en procédant comme exposé ci-dessous.

L'oléate de potassium, le cholestérol, le sulfate de cholestérol et le laureth 4 sont préalablement mélangés sous agitation magnétique à 55°C pendant 1 h. A la pâte obtenue, refroidie à température ambiante sont lentement additionnés sous agitation douce la solution aqueuse d'HSA (ou de l'eau pure pour les microvésicules vides) puis la phosphatidylcholine. Le mélange est ensuite introduit dans une cellule de cisaillement constituée de deux cylindres coaxiaux, dont l'un est fixe et l'autre en rotation. Ce type de dispositif est décrit dans le

brevet WO93/19735. Le cisaillement d'environ 10 s^{-1} est maintenu pendant 1 h. L'échantillon est ensuite dispersé dans l'eau stérile, à raison de 250 mg de pâte pour 1 ml d'eau.

Une seconde dilution est effectuée avant l'injection, à raison de 0,5 ml de la solution précédente dans 2 ml d'eau stérile. Pour les échantillons contenant un adjuvant, celui-ci est préalablement incorporé dans l'eau de dispersion à raison de 5 μl de solution aqueuse d'adjuvant (à 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dans 1,995 ml d'eau. On obtient donc dans la solution injectée une concentration de 20 μg d'antigène pour 100 μl de volume injectable, et dans le cas où l'adjuvant est utilisé sa concentration finale est de 4 μg pour 100 μl .

Le taux d'encapsulation est estimé par dosage après séparation des vésicules du surnageant puis libération de l'antigène. La dispersion de vésicules est ultracentrifugée (40 000 rpm, 1 h). Le culot de vésicules, est dilué 10 fois par une solution à 10 % en sel de déoxycholate de sodium. La suspension de vésicules détruites par le sel de déoxycholate est soumise à un effet vortex intense puis ultracentrifugée (50 000 rpm, 60 minutes). Le dosage de l'antigène est réalisé par spectrophométrie sur le culot par la technique de Bradford (Analytical Biochemistry, 1976, 72, p. 248) en recourant au dosage "Bio-Rad protein assay" conformément au protocole fourni (Bio-Rad Laboratories, USA).

Les valeurs associées au culot et correspondant à la quantité d'antigène encapsulé (HSA) sont de $80 \% \pm 5\%$.

La taille moyenne des vésicules multilamellaires contenant l'HSA est mesurée par la technique de diffusion dynamique de la lumière. On trouve une taille de 0.218 μm avec une polydispersité de 20 %, ce qui montre qu'on a un échantillon homogène quant à la taille des vésicules.

Exemple 2

Dosage de la réponse immunitaire

a) Protocole de vaccination

On détermine la réponse immunitaire d'un antigène microencapsulé administré in-vivo en recourant à un modèle murin.

Un protocole de vaccination accéléré a été mis en place afin de tester la capacité des vecteurs à induire rapidement une réponse immunitaire. Trois injections sur vingt jours ont été réalisées puis des dosages des immunoglobulines totales (IgG, IgM) à deux et quatre semaines ont été effectués. A deux et quatre

semaines, les concentrations en immunoglobulines de différentes sous-classes ont été titrées.

Quatre formulations différentes (notées de 1 à 4) contenant les mêmes quantités d'antigènes, et deux formulations témoins (notées 5 et 6) ont été testées :

- 5 1) l'antigène seul
- 2) l'antigène associé à un adjuvant connu (QS21 de AQUILA, USA)
- 3) l'antigène encapsulé dans les microvésicules multilamellaires de tensioactifs selon l'exemple 1
- 4) l'antigène encapsulé dans les microvésicules multilamellaires de tensioactifs selon l'exemple 1 associées au QS21
- 10 5) les microvésicules multilamellaires de tensioactifs analogues à celles obtenues selon l'exemple 1 mais vides
- 6) les microvésicules multilamellaires de tensioactifs analogues à celles obtenues selon l'exemple 1 mais vides associées à l'adjuvant QS21.

- 15 Toutes les formulations ont été préparées de manière à ce qu'un volume d'injection de 100 µl contienne 20 µg d'antigène (libre ou encapsulé), et lorsqu'il est présent, 4µg d'adjuvant QS21 (cf. ci-dessus).

- Le modèle murin est celui de souris Balb-C femelles âgées de 8 semaines, d'un poids moyen de 20 g. Dix jours s'écoulent entre la première et la
- 20 seconde injection intrapéritonéale. La troisième et dernière administration est intraveineuse 10 jours plus tard. Le protocole s'échelonne donc sur 20 jours au total. Le même protocole est suivi pour les six formulations correspondant aux six groupes de quatre souris numérotés de 1 à 6. Chaque groupe a été traité avec la formulation de même numéro.

- 25 Les animaux sont maintenus dans des conditions "normales" , nourris ad libidum et normalement hydratés.

- Deux prélèvements sanguins (prélèvement rétro-orbitaire) sont effectués à 2 et 4 semaines après la dernière injection, afin de doser les immunoglobulines totales (IgG, IgM) sur le sérum après centrifugation du sang
- 30 total hépariné.

b) Résultat : dosage de la réponse immunitaire globale

- Le dosage de la réponse immunitaire globale se fait en titrant les immunoglobulines par un test ELISA (Saunders G.C. "Immunoassays in the
- 35 clinical laboratory" Ed. By Nakamura et al, 1979) à l'aide d'immunoglobulines de lapin anti-immunoglobulines de souris (Institut Pasteur, Paris), marquées à la

peroxydase. Les immunoglobulines fixées sont révélées par l'addition du substrat de l'enzyme.

La mesure effectuée dans ce test est classiquement une mesure d'absorbance à 405 nm, le produit de la réaction enzymatique formé dans le test ELISA absorbant la lumière à cette longueur d'onde. La méthode d'analyse utilisée donne des résultats identiques à la mesure de l'absorbance à mi-hauteur de la saturation, mais avec plus de précision pour les faibles valeurs et procède par une méthode permettant d'accéder à une grandeur proportionnelle à la quantité d'antigènes présente dans le sérum par paramétrage des courbes donnant l'absorbance en fonction de la dilution. En effet, la loi de dilution peut être modélisée de la façon suivante :

$$I(D) = I_0 + \frac{I_s}{(1 + C_0 D)}$$

où :

15 $I(D)$ est l'absorbance mesurée à la dilution D

I_0 est le bruit de fond de la mesure

I_s est la mesure à la saturation (plateau)

C_0 est proportionnel à la concentration en anticorps cherchée (C_0 a la grandeur d'une concentration).

20 I_0 est mesuré directement. I_s est obtenu à partir d'une expérience dont la réponse est suffisante pour atteindre la saturation. La valeur obtenue est alors utilisée dans le paramétrage des autres mesures de la même série d'expériences, même si pour ces dernières la saturation n'est jamais atteinte.

25 Le paramétrage des courbes permet de déduire C_0 pour chaque expérience, donc un nombre proportionnel à la quantité d'anticorps présents dans le sérum étudié.

30 Cette méthode est plus fine que la simple mesure de la dilution pour obtenir le demi-plateau, puisqu'elle permet d'obtenir une mesure, même en l'absence de saturation. Elle est donc particulièrement adaptée aux faibles réponses.

Les résultats à deux semaines et à quatre semaines (après la fin du protocole vaccinal) pour l'ensemble des préparations sont donnés dans le tableau 1 suivant.

Les valeurs obtenues par cette méthode sont indiquées dans le tableau 1 ci-dessous et sont donc proportionnelles au taux d'immunoglobulines présentes dans le sang.

5

TABLEAU 1

Groupe de souris et N° de formulation	1	2	3	4	5	6
Réponse à 2 semaines	-	-	145	335	-	-
Réponse à 4 semaines	-	7	467	894	-	-

Le signe "-" correspond à une réponse inférieure à 2, jugée non significative.

10

On voit donc que, dès 2 semaines, on obtient une réponse immunitaire significative pour les formulations encapsulées (avec ou sans adjuvant). Au bout de quatre semaines, les formules encapsulées donnent une réponse très importante, plus de 50 fois supérieure à la réponse de l'antigène associé à l'adjuvant et plus de 100 fois supérieure lorsque l'on ajoute l'adjuvant QS21 à l'antigène encapsulé.

REVENDICATIONS

1. Vecteur d'antigène, caractérisé en ce que qu'il est constitué d'une dispersion de vésicules multilamellaires au sein desquelles ledit antigène se trouve
5 au moins partiellement encapsulé, lesdites vésicules étant constituées de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites bicouches étant concentriques et conférant auxdites vésicules une structure en oignon.

2. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites vésicules ont un diamètre inférieur à 10 μm , de préférence inférieur à 1 μm , de
10 préférence compris entre 0,1 et 1 μm .

3. Vecteur selon la revendication 2, caractérisé en ce que lesdits agents tensioactifs constituant lesdites bicouches sont choisis dans le groupe constitué :

- des phospholipides hydrogénés ou non hydrogénés,
- des acides gras en C_6 à C_{18} , saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou
15 ramifiés, sous forme d'acide ou de sel d'un métal alcalin, alcalino-terreux ou d'une amine,
- des esters, éthoxylés ou non, de ces mêmes acides gras et
 - . de saccharose,
 - . de sorbitan,
 - 20 . de mannitol,
 - . de glycérol ou de polyglycérol,
 - . de glycol,
- des mono-, di- ou triglycérides ou des mélanges de glycérides de ces mêmes acides gras,
- 25 - des alcools gras en C_6 à C_{18} , saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, éthoxylés ou non,
- des éthers, éthoxylés ou non, de ces mêmes alcools gras et
 - . de saccharose,
 - . de sorbitan,
 - 30 . de mannitol,
 - . de glycérol ou de polyglycérol,
 - . de glycol,
- des huiles végétales polyéthoxylées, hydrogénées ou non hydrogénées,
- des polymères séquencés de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène
35 (poloxamères),
- de l'hydroxystéarate de polyéthylèneglycol,

- des alcools à squelette stérol tel que le cholestérol, le sistostérol.

4. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les bicouches desdites vésicules comprennent au moins deux agents tensioactifs dont l'un présente une balance hydrophile-lipophile (HLB) comprise entre 1 et 6, de préférence comprise entre 1 et 4, et l'autre une balance hydrophile-lipophile (HLB) comprise entre 3 et 15, de préférence comprise entre 5 et 15.

5. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le rendement d'encapsulation est supérieur à 50 %, de préférence supérieur à 80 %.

6. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit antigène est un antigène protéique.

7. Vecteur selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit antigène protéique est constitué d'une protéine naturelle ou recombinante.

8. Composition thérapeutique contenant au moins un antigène, caractérisée en ce que ledit(lesdits) antigène(s) se trouve(nt) au moins partiellement encapsulé(s) dans les vésicules multilamellaires d'un vecteur tel que défini selon l'une des revendications 1 à 7.

9. Procédé de préparation d'une composition selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif et incorporant le(les) antigène(s),

- transformation de la phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires à structure en oignon, par cisaillement,

- dispersion dans une solution aqueuse pour obtenir la concentration voulue en antigène(s).

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit cisaillement est un cisaillement homogène.

11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce qu'on utilise au moins 2 tensioactifs dont l'un présente une HLB comprise entre 1 et 6, de préférence de 1 et 4, et l'autre une HLB comprise entre 3 et 15, de préférence entre 5 et 15.

12. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que ledit antigène est un antigène protéique.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des données revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2769022

N° d'enregistrement
national

FA 548646
FR 9712085

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	WO 95 22961 A (INSTITUT PASTEUR ET AL.) 31 août 1995 * page 6, ligne 3 - page 7, ligne 27; revendications 1-10 *	1-12
Y	FR 2 735 658 A (CAPSULIS SOCIETE ANONYME) 27 décembre 1996 * page 2, ligne 12 - ligne 24; revendications 1-9,11,12 * * page 5, ligne 6 - page 6, ligne 6 * * page 6, ligne 28 - page 9, ligne 10 *	1-12
D,Y	WO 93 19735 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 14 octobre 1993 * page 2, ligne 18 - ligne 24; revendications * * page 3, ligne 16 - ligne 19 * * page 6, ligne 1 - ligne 6 * * page 14, ligne 8 - ligne 25 *	1-12
A	N.M. WASSEF ET AL.: "LIPOSOMES AS CARRIERS FOR VACCINES" IMMUNOMETHODS, vol. 4, juin 1994, SAN DIEGO, CA, US, pages 217-222, XP000601673 * le document en entier *	1-12
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
9 juin 1998		Ryckebosch, A
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)